



EXPLORER 2.0

ZE/EX2/96i
ZE/EX2/288i

**Test for detection of
inhibitory substances in food**

**Test para la detección de
sustancias antibacterianas en alimentos**

ZEULAB, S.L.
C/ Bari, 25 dpdo. • 50197 Zaragoza (SPAIN)
Tel.: +34 976 731 533 • Fax: +34 976 524 078
info@zeulab.com • www.zeulab.com

OBJETIVO

EXPLORER es un test cualitativo, cómodo y flexible para la detección de antibióticos e inhibidores en alimentos.

PRINCIPIO

EXPLORER es un test basado en la inhibición del crecimiento microbiano. El kit se presenta en formato de placa microtiter cuyos pocillos contienen un medio de cultivo específico con esporos de *Geobacillus* termófilo y un indicador ácido base.

Tras la incubación de los tests a 65°C, los esporos germinan y se multiplican acidificando el medio y provocando el viraje del indicador de un color morado a amarillo. Si la muestra contiene una concentración de antimicrobiano superior al límite de detección del test, el crecimiento del microorganismo se inhibe y por lo tanto no se producirá el cambio de color del medio.

COMPONENTES DEL KIT

	ZE/EX2/96i	ZE/EX2/288i
Tests individuales	96	288
Placa microtiter	1	3
Lámina adhesiva	1	3
Guión de instrucciones	✓	✓
Certificado de producto	✓	✓

MATERIAL Y EQUIPAMIENTO ADICIONAL (NO INCLUIDO)

- ✓ Balanza de laboratorio
- ✓ Microondas: para la preparación de muestras de músculo de carne, hígado y riñón
- ✓ Baño de agua: para la preparación de muestras de huevo
- ✓ Micropipetas
- ✓ Centrífuga
- ✓ Incubador (Fx Incubator ref. ZE/FX) o estufa a 65°C
- ✓ Control negativo (muestra sin antibióticos):
 - para análisis de músculo de carne, hígado, riñón y huevo: jugo de estas matrices previamente analizado y con resultado negativo. El jugo se obtiene siguiendo la preparación de muestras descrita en el siguiente apartado, y se congela en alícuotas.
 - para el análisis de músculo de carne: control negativo liofilizado (ref. ZE/EX/CN5).
 - para análisis de pienso: PBST (ver composición en “Preparación de muestras”)
- ✓ Controles positivos liofilizados: Penicilina G (ref. ZE/PG5), oxitetraciclina (ref. ZE/OXITETRA) y sulfatiazol (ref. ZE/SULFA) -opcional.

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Leer el apartado “Observaciones” en página 11 antes de realizar el ensayo.

Para la preparación de muestras de carne, hígado y riñón es necesario realizar una extracción de jugo usando un microondas. Es importante realizar este calentamiento correctamente ya que un exceso puede evaporar el jugo y una falta de calor puede producir interferencias en el resultado. Por favor, siga las instrucciones y visite www.zeulab.com para encontrar información adicional.

Muestras de músculo de carne

La muestra debe ser carne magra, sin tejido adiposo ni conjuntivo

1. Pesar $3 \pm 0,5$ g en un tubo resistente al calor (de aprox. 1,5 cm de diámetro) con tapa de rosca. Cerrar el tubo casi por completo.
2. Introducir el tubo en un recipiente con agua. El agua debe cubrir la muestra para una correcta transferencia del calor. Ver figura 1.
3. Colocar el recipiente en el microondas en función “descongelado” durante aprox. 3-4 min, hasta que la muestra esté completamente cocinada. El tiempo de calentamiento puede variar dependiendo del microondas, el tipo de muestra y el número de tubos en el recipiente.
4. Retirar la porción de carne con unas pinzas. Transvasar el jugo obtenido a un eppendorf y centrifugar a 2000g durante 1-2 min. Alternativamente, se puede filtrar a través de un filtro $0,45 \mu\text{m}$ o decantar las partículas sólidas durante unos minutos.
5. El jugo está preparado para el análisis.



Fig. 1

Muestras de hígado

1. Pesar $5 \pm 0,5$ g de hígado, trocear la muestra e introducirla en un tubo resistente al calor (de aprox. 1,5 cm de diámetro) con tapa de rosca. Cerrar el tubo casi por completo.
2. Introducir el tubo en un recipiente con agua. El agua debe cubrir la muestra para una correcta transferencia del calor. Ver figura 1.
3. Colocar el recipiente en el microondas en función “descongelado” durante aprox. 3-4 min, hasta que la muestra esté completamente cocinada. El tiempo de calentamiento puede variar dependiendo del microondas, el tipo de muestra y el número de tubos en el recipiente.
4. Retirar la porción de hígado con unas pinzas. Transvasar el jugo obtenido a un eppendorf y centrifugar a 2000g durante 1-2 min. Alternativamente, se puede filtrar a través de un filtro $0.45 \mu\text{m}$ o decantar las partículas sólidas durante unos minutos.
5. El jugo está preparado para el análisis.

Muestras de riñón

La muestra troceada debe incluir médula y cortex.

1. Pesar $5 \pm 0,5$ g en un tubo resistente al calor (de aprox. 1,5 cm de diámetro) con tapa de rosca. Cerrar el tubo casi por completo.
2. Introducir el tubo en un recipiente con agua. El agua debe cubrir la muestra para una correcta transferencia del calor. Ver figura 1.
3. Colocar el recipiente en el microondas en función “descongelado” durante aprox. 3-4 min, hasta que la muestra esté completamente cocinada. El tiempo de calentamiento puede variar dependiendo del microondas, el tipo de muestra y el número de tubos en el recipiente.
4. Retirar la porción de riñón con unas pinzas. Transvasar el jugo obtenido a un eppendorf y centrifugar a 2000g durante 1-2 min. Alternativamente, se puede filtrar a través de un filtro 0.45 μm o decantar las partículas sólidas durante unos minutos
5. El jugo está preparado para el análisis.

Muestras de huevo

1. Verter los huevos en un recipiente limpio y batir hasta obtener un fluido uniforme, sin grumos.
2. Mezclar 10 mL de huevo con 10 mL de agua destilada. Usar un tubo resistente al calor (de aprox. 50 mL de volumen), con tapón de rosca. Cerrar el tubo casi por completo.
3. Calentar durante 3 min. a aproximadamente 100°C usando un baño de agua.
4. Tras retirar el tubo, agitar (20-30 segundos) para evitar que coagule el fluido. Dejar enfriar a temperatura ambiente (aprox. 5 min)
5. La mezcla está preparada para el análisis.

Existe un método alternativo de preparación de muestras de huevo para mejorar la sensibilidad en comparación con el protocolo anterior. Contacte con ZEU o su distribuidor habitual.

Muestras de pienso

1. Pesar $1 \pm 0,1$ g de pienso molido en un tubo limpio y con tapa.
2. Añadir 20 mL de PBST previamente calentado (40°C aproximadamente)
PBST (1 L): 9 g de NaCl, 16 mL de K_2HPO_4 0,5 M, 3,36 mL KH_2PO_4 0,5 M, 0,5 mL Tween 20, ajustar el pH a 7,4 (con K_2HPO_4 o KH_2PO_4).
3. Homogeneizar en un agitador de rodillos o agitador magnético durante al menos 30 minutos hasta lograr una adecuada solubilidad del pienso.
4. Centrifugar 15 min a 2000g. Alternativamente se puede filtrar a través de un filtro de 0,45 μm .
5. El sobrenadante está preparado para el análisis.

PROCEDIMIENTO DEL TEST (Esquema del procedimiento en la página 12)

1. Sacar los pocillos del marco blanco presionando por la parte inferior. Seleccionar el número de tests necesarios para el análisis doblando ligeramente las tiras de 8 tests y cortando estas tiras con tijeras. A continuación, cortar la tira para elegir el número de tests. Es importante no despegar la lámina de los pocillos que no se vayan a usar y guardarlos en refrigeración (4-16°C), de lo contrario el medio podría secarse.
2. Retirar la lámina adhesiva. Aplicar 100 µL de control negativo y 100 µL de la muestra en pocillos diferentes.
3. Incubar los tests a temperatura ambiente durante el tiempo indicado en la siguiente tabla. Este tiempo depende de la matriz a analizar. En este paso no es necesario sellar los pocillos.

Carne	20 min
Hígado	20 min
Riñón	20 min

Pienso	20 min
Huevos	60 min

4. Eliminar la muestra de los tests volcando la placa. Lavar los pocillos con agua destilada llenándolos con un frasco lavador. A continuación, vaciar los pocillos dando la vuelta a la placa y golpeando los pocillos suavemente contra papel absorbente.
5. Sellar cuidadosamente los tests con la lámina adhesiva e incubar a 65°C ± 1°C.
6. Revisar los tests en el tiempo indicado en el certificado de producto. Este tiempo es orientativo. Parar la incubación cuando el control negativo haya virado a color amarillo como en la carta de colores (rango de 2h 30 a 3h 15). Si el control negativo todavía no es amarillo, incubar los pocillos durante más tiempo (aprox. 10-15min) hasta que el control negativo haya cambiado.
7. Resultados.

- ✓ Lectura visual: Invertir la placa y comparar los colores de las muestras con el control negativo. Los pocillos de color morado-marrón se identificarán como positivos y los pocillos amarillos como negativos. Colores diferentes al control negativo indican que la muestra contiene inhibidores. Ver carta de colores (p. 12). El análisis debe repetirse en caso de duda.
- ✓ Lectura fotométrica: Medir la absorbancia de las muestras a longitudes de onda de 595 nm (filtro 1) y 650 nm (filtro 2). El ensayo debe pararse cuando la diferencia de absorbancias del control negativo (AN 595nm - AN 650nm) tenga un valor comprendido entre 0,30 y 0,45. Las muestras con valores superiores o iguales a la suma del valor obtenido para el control negativo más un valor de 0,3 serán consideradas positivas.

POSITIVO: $AM\ 595nm - AM\ 650nm \geq AN\ 595nm - AN\ 650nm + 0.30$

AM: Absorbancia de la muestra AN: Absorbancia del control negativo

Nota: Este criterio sólo es válido cuando el control negativo tiene un valor de AN 595nm - AN 650nm comprendido entre 0,30 y 0,45.

OBSERVACIONES

- ✓ Es necesario aplicar siempre un control negativo (muestra carente de antibióticos) junto con el resto de muestras para determinar el tiempo óptimo de incubación de cada ensayo.
- ✓ Se recomienda aplicar un control positivo, muestra con una concentración de antibiótico por encima del LOD del test.
- ✓ Carnes picadas, así como productos cárnicos ahumados, adobados o curados pueden inhibir el test debido a las propias características físico-químicas del producto, sin que ello suponga necesariamente la presencia de residuos de antibióticos y/o sulfamidas en ellas.
- ✓ Si las muestras no pueden ser analizadas inmediatamente, se pueden almacenar en refrigeración durante 24 horas o en congelación si va a transcurrir un periodo más prolongado. Antes de comenzar el ensayo se deben descongelar las muestras.
- ✓ Utilizar pipetas calibradas para añadir las muestras.
- ✓ Utilizar una punta de pipeta limpia para cada muestra.
- ✓ Este ensayo es muy sensible a los antibióticos y a otros antimicrobianos como detergentes y desinfectantes, por lo que debe evitarse la contaminación de las muestras y el material utilizado con dichas sustancias.

ESTABILIDAD Y ALMACENAMIENTO

Conservar los componentes del kit a 4-16°C en oscuridad. El kit se suministra con una caducidad mínima de 9 meses. Consultar la fecha de caducidad indicada en el envase

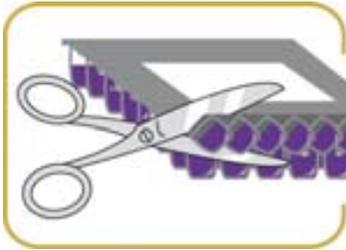
PRECAUCIONES DE USO

Se recomienda el uso de unas correctas prácticas de laboratorio. Existe una HOJA DE SEGURIDAD disponible bajo solicitud a través de su distribuidor habitual o ZEULAB.

EXPLORER es un test de diagnóstico *in vitro* para cribado o screening. Los análisis que pudieran tener una implicación de tipo legal deberían realizarse por duplicado o triplicado y confirmarse mediante un procedimiento oficial. **ZEULAB** no asume ninguna responsabilidad legal.

FLOWCHART PROCEDURE

ESQUEMA DEL PROCEDIMIENTO



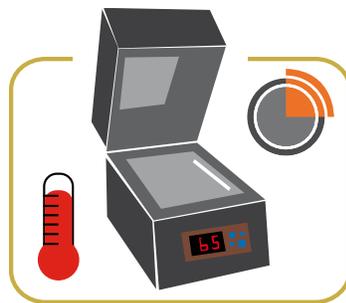
Select the required number of tests for the analysis

Seleccionar el número de tests necesarios para el análisis



Add 100 μ L of sample

Añadir 100 μ L de muestra

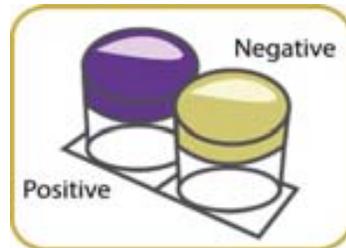


Diffuse at room T^a / *min
*See test procedure

*Difundir a T^a ambiente / *min
Ver procedimiento del test

Wash with distilled water

Lavar con agua destilada



Visual reading from the bottom of the wells
Photometrical reading at 595nm and 650nm

*Lectura visual desde el fondo del pocillo
Lectura fotométrica a 595nm y 650nm*

Colour card

Carta de colores



+



+



+



+



-



-